

TRAITEMENT DE LA COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

08 mars 2001 (08.03.01)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

340363/17777

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale no

PCT/FR99/02734

Date du dépôt international (jour/mois/année)

08 novembre 1999 (08.11.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐

le déposant

☐

l'inventeur

☒

le mandataire

☐

le représentant commun

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01-45-00-92-02

no de télécopieur

01-45-00-46-12

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐

la personne

☐

le nom

☒

l'adresse

☐

la nationalité

☐

le domicile

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01-44-29-35-00

no de télécopieur

01-44-29-35-99

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒

à l'office récepteur

☐

aux offices désignés concernés

☐

à l'administration chargée de la recherche internationale

☒

aux offices élus concernés

☐

à l'administration chargée de l'examen préliminaire international

☐

autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Philippe Bécamel

no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 26 juin 2000 (26.06.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02734	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340363/17777
Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 novembre 1999 (08.11.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 06 novembre 1998 (06.11.98)
Déposant BONNEFOY, Jean-Yves etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

29 mai 2000 (29.05.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Christelle Croci no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------

TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 juillet 2001 (20.07.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340363/17777	
Demande internationale no PCT/FR99/02734	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 novembre 1999 (08.11.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse BAUSSANT, Thierry 35, rue Jean Jaurès F-01200 Bellegarde FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse BAUSSANT, Thierry 4, rue Alphonse Baudin F-01200 Bellegarde FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Philippe Bécamel no de téléphone (41-22) 338.83.38
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 16 OCT 2000

WIPO PCT



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340363/17777	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02734	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 06/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K39/385		
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 3 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 29/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 12.10.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Mennessier, T N° de téléphone +49 89 2399 8687 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02734

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-16 version initiale

Revendications, N°:

1-24 reçue(s) avec télécopie du 22/09/2000

Dessins, feuilles:

1/4-4/4 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 1-24.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02734

parce que :

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s 1-24 (en ce qui concerne la possibilité d'application industrielle) en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :

voir feuille séparée

- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :

- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.

- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-24 Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-24 Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications voir point 3.d) de la feuille séparée Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

1. Commentaires concernant le point I

L'opinion est également établie sur la base des pages 1 à 4 de la liste de séquences.

2. Commentaires concernant le point III

La présente Administration considère que l'objet des revendications 1-25 est visé par les dispositions de la règle 67.1 (iv) PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de ces revendications est susceptible d'**application industrielle** (article 34(4) a) i) PCT).

3. Commentaires concernant le point Va) Document cité

Il est fait référence au document suivant:

D1: WO 96/14415

Le demandeur pour cette demande internationale PCT est celui de la présente demande en cours d'examen. L'un des inventeurs de D1 est également désigné dans la présente demande.

b) Nouveauté (article 33(2) PCT)

Une utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique telle que définie à la revendication 1 n'est pas en tant que telle décrite dans l'un quelconque des documents cités dans le rapport de recherche internationale. L'objet de la revendication 1 peut donc être considéré comme **nouveau**. Il en va de même *de facto* pour celui des autres revendications (2 à 24), étant donné qu'elles en sont dépendantes.

c) Activité inventive (article 33(3) PCT)

- (i) Il y a lieu de prendre en considération le document D1 estimé représentant l'état de la technique le plus proche.
- (ii) Il concerne notamment une composition pharmaceutique qui est un complexe immunogène comprenant un antigène ou un haptène associé à au moins une partie de la protéine P40 [= OmpA] de *Klebsiella pneumoniae* (voir revendication 8), l'antigène ou l'haptène pouvant être associé à l'adjuvant par une liaison covalente (voir revendication 9) constituant une molécule de fusion dont la préparation fait appel aux techniques du génie génétique (voir revendication 14).
- (iii) Aux lignes 7 à 9 de la page 3, donnant une explication à l'effet d'adjuvant de la protéine P40 mis en évidence, il est suggéré explicitement que la reconnaissance spécifique [des] séquences [d'intérêt de la protéine P40] par des cellules présentatrices d'antigènes permettrait de cibler ces antigènes vers ces cellules.
- (iv) Par contre, il y a lieu de constater que les lignes 7 à 10 de la page 3 du document D1 ne suggèrent aucunement, qu'elles soient considérées en tant que telles ou en combinaison avec le contenu de l'un quelconque des autres documents cités dans le rapport de recherche internationale, que l'OmpA d'une entérobactérie ou l'un de ses fragments puisse être effectivement internalisé(e) dans les cellules présentatrices d'antigènes. **La revendication 1 apporte donc une solution**, au problème technique posé par la mise en évidence d'un composé capable de se fixer spécifiquement sur de telles cellules puis d'être internalisé, **qui implique une activité inventive**.
- (v) La même conclusion s'applique *de facto* aux revendications dépendantes 2 à 24.

d) Application industrielle (Article 34 PCT)

Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les revendications 1-24 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B.
4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont les cellules dendritiques.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.
8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :
 - a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
 - b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
 - c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).
9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides et les substances chimiques.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'ladite substance biologiquement active est couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

5 11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage chimique.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou de ladite substance biologiquement active pour faciliter le couplage chimique.

10 13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

14. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

15 15. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est un antigène ou un haptène.

16. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 15, pour moduler la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

20 17. Utilisation selon la revendication 16, pour améliorer la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

18. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules présentatrices d'antigènes.

25 19. Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules dendritiques.

30 20. Utilisation selon l'une des revendications 18 et 19, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes, les allergies, les rejets de greffes, les maladies cardiovasculaires, les maladies du

système nerveux central, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses ou les maladies liées à une immunodéficience.

21. Utilisation selon la revendication 20, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse ou un cancer associé à un antigène tumoral.

22. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant de l'immunité.

23. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 22, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

24. Utilisation selon la revendication 23, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous la forme d'un liposome, d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340363/17777	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 02734	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/11/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 06/11/1998
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau International.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.
2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

UTILISATION D'UNE PROTEINE OMPA D'ENTEROBACTERIE, POUR LE CIBLAGE SPECIFIQUE VERS LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE, POUR LE CIBLAGE SPECIFIQUE VERS LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES

5 L'invention concerne l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, de préférence la protéine P40 *Klebsiella pneumoniae*, pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques humaines. L'invention a également pour objet l'utilisation de la protéine OmpA pour la préparation d'une composition
10 pharmaceutique destinée à la prévention et/ou le traitement de maladies, notamment les cancers associés à un antigène tumoral; les maladies auto-immunes ou les maladies infectieuses.

La vaccination est un moyen efficace de prévenir ou réduire les infections virales ou bactériennes. Le succès des campagnes de vaccination dans ce domaine a permis d'étendre le concept de vaccin dans d'autres domaines tels que celui du cancer
15 et des maladies auto-immunes. En ce qui concerne par exemple certaines formes d cancer, l'inefficacité de thérapies classiques et/ou leurs effets secondaires, comme la chimio- ou la radiothérapie, a motivé la recherche de thérapie alternative. Ainsi, les antigènes tumoraux spécifiques exprimés à la surface des cellules tumorales peuvent être utilisés comme cible en immunothérapie pour l'élimination de ces cellules. Un des
20 problèmes majeurs couramment rencontrés pour la préparation de ces vaccins est que les antigènes vaccinaux lorsqu'ils sont administrés seuls chez l'hôte, ne sont pas assez immunogéniques pour induire une réponse immunitaire suffisamment efficace pour conférer la protection recherchée. Ces antigènes sont ainsi souvent couplés de manière covalente à une molécule porteuse telle que par exemple épitope de la toxine
25 diphtérique, l'anatoxine tétanique (TT), un antigène de surface du virus de l'hépatite B, l'antigène VP1 du virus de la poliomyélite ou tout autre toxine ou antigène viral ou bactérien tel que des protéines antigéniques issues de la membrane externe d'entérobactérie qui ont la propriété de potentialiser la réponse immunitaire (humorale et cellulaire) de l'antigène qui lui est associée comme la protéine OmpA nommée P40
30 issue de *Klebsiella pneumoniae* (décrite dans les demandes internationales de brevet WO 95/27787 et WO 96/14415). Néanmoins, dans la plupart des cas un autre composant s'est avéré nécessaire pour augmenter l'efficacité du vaccin, et actuellement le seul adjuvant autorisé chez l'homme est l'Alum.

Grâce à l'immunologie, il a été récemment découvert que les cellules dendritiques (CD) jouaient un rôle majeur dans le système immunitaire. Ces cellules, dérivées des cellules souches de la moelle osseuse, sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles impliquées dans la réponse immune primaire spécifique d'un antigène (Peters J. et al., 1996). Elles ingèrent ou internalisent les antigènes et présentent les fragments de ces antigènes à des cellules T naives. Cette ingestion induit à la surface des cellules dendritiques l'expression de molécules de costimulation telles le CD80 et le CD86. Ces molécules permettent une interaction étroite avec les cellules T (Girolomoni G. et Ricciardi-Castagnoli P., 1997, Immunol. Today, 18, 102-104). Les cellules dendritiques sont distribuées de manière diffuse dans les tissus. Elles sont retrouvées aux niveaux de la peau et des organes lymphoïdes (Hinrich J. et al., 1996, Immunol. Today, 17, 273-277).

Grâce à leur efficacité à présenter les antigènes et à stimuler le système immunitaire, les cellules dendritiques ont été utilisées pour générer des réponses cytotoxiques CTL antivirales (Ludewig B. et al., 1998, J. Virol., 72, 3812-3818 ; Brossard P. et al., 1997, J. Immunol., 158, 3270-3276) ou anticancéreuses (Nestle F.O. et al., 1998, Nat. Med., 4, 328-332). Les approches ont consisté à charger les cellules dendritiques *ex vivo* avec l'antigène d'intérêt (peptides ou lysat cellulaire) et réimplanter ces cellules chez le patient. D'autres approches consistent à transfecter *ex vivo* les cellules dendritiques avec le gène codant pour l'antigène d'intérêt et à réinjecter ces cellules transfectées (Gilboa E. et al., 1998, Cancer Immunol. Immunother., 46, 82-87). Ces approches ont été utilisées avec succès chez la souris et récemment chez l'homme (Hsu F.J. et al., 1996, Nat. Med., 2, 52-58). Les cellules dendritiques chargées en antigènes présentent les peptides par le biais de molécules de classe I ou II et induisent l'activation des lymphocytes T CD4 ou CD8+. Par conséquent, la possibilité de diriger les antigènes désignés, tels que des protéines ou des polysaccharides, ou des vecteurs viraux capables de transférer des gènes codant pour ces antigènes vers les cellules dendritiques permettrait d'améliorer l'efficacité de la stimulation du système immunitaire. De plus, le ciblage spécifique des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), notamment les cellules dendritiques, permettrait d'éviter les étapes de prélèvement, de purification, de traitement *ex vivo* de cellules CPA autologues ou hétérologues avec les antigènes tumoraux ou les vecteurs viraux et la réimplantation des cellules CPA traitées.

Afin de cibler spécifiquement les cellules dendritiques avec des substances actives d'intérêt, telles que des protéines ou des vecteurs viraux capables de transférer

des gènes codant pour ces protéines d'intérêt, de nombreux travaux ont consisté à identifier des molécules qui se fixeraient préférentiellement sur les cellules dendritiques ou des récepteurs qui seraient exprimés spécifiquement sur les cellules dendritiques. Un récepteur DEC 205 impliqué dans la prise en charge de l'antigène a été identifié sur
5 des cellules dendritiques murines (Jiang W. et al., 1995, *Nature*, 375, 151-155) et humaines (Kato M. et al., 1998, *Immunogenetics*, 47, 442-450). L'analyse de la structure de ce récepteur met en évidence des domaines de reconnaissance d'hydrates de carbone qui seraient impliqués dans la capture, l'internalisation et/ou la
10 présentation d'antigènes portant des résidus d'hydrates de carbone. Néanmoins, les auteurs ne donnent aucune information sur les ligands pouvant être fixés par ce récepteur. D'autre part, les auteurs mentionnent que les domaines de reconnaissance d'hydrates de carbone du récepteur DEC-205 qui seraient impliqués dans la capture, l'internalisation et/ou la présentation d'antigènes (domaines riches en cystéine) sont également présents dans plus de 50 protéines dont certains récepteurs cellulaires.

15 Ainsi, il existe aujourd'hui un besoin de disposer d'un composé capable de cibler spécifiquement une cellule présentatrice d'antigène (CPA), notamment une cellule dendritique, et qui soit capable en outre d'être internalisé par ladite cellule. Un tel composé capable de se fixer spécifiquement sur ces cellules, puis d'être internalisé aurait comme avantage de pouvoir être utilisé comme composé pour le transport et le
20 ciblage de substance biologiquement active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à la fixation et/ou à l'internalisation de cette substance par ces cellules. D'autre part, il serait avantageux que ce composé recherché puisse être facilement associé à la substance active par couplage chimique, par couplage résultant d'une fusion génétique ou puisse être exprimé à la surface d'une cellule hôte ou encore à la surface d'une
25 particule virale pour le transfert de gène d'intérêt dans ces cellules CPA.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence de manière
surprenante qu'une protéine de la membrane externe de type OmpA d'entérobactérie, notamment la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*, est capable non seulement de se fixer spécifiquement sur une cellule CPA mais également capable d'être internalisée
30 par ladite cellule CPA, notamment par une cellule dendritique.

Ainsi, la présente invention est relative à l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes.

35 Par cellules présentatrices d'antigènes, on entendra désigner dans la présente invention, les cellules CPA professionnelles formant partie intégrante du système

immunitaire tels que les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B ou les monocytes.

Dans la présente invention, on entendra désigner également par le terme « protéine » les peptides ou les polypeptides et par le terme « OmpA » (pour « Outer
5 Membrane Protéin »), les protéines de la membrane externe de type A.

Par fragment d'une protéine OmpA, on entend désigner tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la protéine OmpA capable de se fixer spécifiquement sur les cellules CPA, notamment les cellules dendritiques, et comprenant au moins 5 acides aminés, de préférence 10 acides
10 aminés ou de manière plus préférée 15 acides aminés, lesdits fragments étant en outre capables d'être internalisés dans lesdites cellules CPA.

Par « substance biologiquement active », on entend désigner tout composé capable d'exercer une activité thérapeutique et dont l'activité peut être modulée par l'intermédiaire des cellules CPA. On peut citer comme exemple de telles substances
15 biologiquement actives, mais sans s'y limiter, les composés immunogènes tels que des antigènes ou haptènes de nature protéique, poly- ou oligosaccharidique, glycoprotéique, lipoprotéique ou en général d'origine organique, ces composés immunogènes pouvant être portés par des structures complexes telles que des bactéries ou des particules virales.

Par « substance biologiquement active », on entend également désigner tout composé capable de modifier l'activité fonctionnelle des cellules CPA, en particulier leur croissance, leur différenciation ou leur système d'expression. On peut citer comme
20 exemple de telles substances biologiquement actives, mais sans s'y limiter, les facteurs de croissance cellulaire dont les cytokines (IL-4, IL-3, GM-CSF, TNF- α), les acides nucléiques codant pour des protéines d'intérêt homologues ou hétérologues et
25 capables d'être exprimées par les cellules CPA.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe spécifiquement
30 sur les cellules présentatrices d'antigènes et en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.

De préférence, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que
35 lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules

dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B, de manière plus préférée, les cellules dendritiques.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.

Les procédés d'extraction de protéines de membrane bactériennes sont connus de l'homme de l'art et ne seront développés dans la présente description. On peut citer par exemple, mais sans s'y limiter le procédé d'extraction décrit par Haeuw J.H. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Dans un autre mode de réalisation préféré, l'invention comprend également l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

Les méthodes de préparation de protéines recombinantes sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description, on pourra néanmoins se référer à la méthode décrite dans les exemples. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces protéines recombinantes, il faut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifère (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4:558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre des baculovirus par exemple (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4:564-572).

De manière tout à fait préférée, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

En particulier, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae*, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;

- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 % ou 95 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).

Par séquence présentant une homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 % ou 95 % avec la séquence de référence SEQ ID N° 2, on entend désigner une séquence d'acides aminés présentant un degré d'identité après alignement optimal respectivement d'au moins 80 %, 85 %, 90 % ou 95 % avec la séquence de référence SEQ ID N° 2, ladite séquence homologue ou l'un de sesdits fragments d'au moins 5 acides aminés tels que définis précédemment en c) étant caractérisés en ce qu'ils se fixent spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes et, le cas échéant, en ce qu'ils sont internalisés dans les cellules présentatrices d'antigènes.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Le meilleur alignement ou alignement optimal est l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer, comme calculé ci-après, est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore BLASTN ou BLASTX, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215,403,1990).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale par fenêtre de comparaison dans laquelle la région de la séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés à comparer peut comprendre des additions ou des
5 déléctions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat
10 obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi les protéines ou les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides et les substances chimiques.

15 La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, notamment par un couplage chimique.

Dans un mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est
20 caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou de ladite substance biologiquement active pour faciliter le couplage chimique, de préférence ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

Selon l'invention, il est possible d'introduire un ou plusieurs éléments de liaison,
25 notamment des acides aminés pour faciliter les réactions de couplage entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et la substance biologiquement active, telle qu'un antigène ou un haptène. Le couplage covalent entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et la substance biologiquement active, telle qu'un antigène ou un haptène selon l'invention peuvent être réalisés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine
30 OmpA, ou l'un de ses fragments. Les réactifs bifonctionnels permettant ce couplage seront déterminés en fonction de l'extrémité de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, choisie pour effectuer le couplage et de la nature de la substance biologiquement active à coupler.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est
35 caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active couplée par liaison

covalente avec ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

5 Les conjugués issus d'un couplage à ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, peuvent être préparés par recombinaison génétique. La protéine chimérique ou hybride (conjugué) peut être produite par des techniques d'ADN recombinant par insertion ou addition à la séquence d'ADN codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, d'une séquence codant pour ladite substance
10 biologiquement active de nature protéique.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des polynucléotides hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer
15 avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par D.V. Goeddel (Gene expression technology, Methods in Enzymology, vol. 185, 3-187, 1990).

L'invention concerne tout particulièrement l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est un antigène ou un haptène.

20 Sous un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention pour moduler la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène, de préférence pour améliorer la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

L'invention comprend également l'utilisation d'une protéine OmpA
25 d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules présentatrices d'antigènes, de préférence par des cellules dendritiques.

De préférence, l'utilisation selon l'invention est relative à la préparation d'une
30 composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes, les allergies, les rejets de greffes, les maladies cardiovasculaires, les maladies du système nerveux central, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses ou les maladies liées à une immunodéficience.

L'invention a en particulier pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse ou un cancer associé à un antigène tumoral.

5 L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant favorisant la réponse immune, tel que l'Alum.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant
10 d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité, notamment sous la forme d'un liposome, d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

15

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

20

Figure 1 : Fixation de rP40-Alexa sur différents types cellulaires.

Après incubation de rP40-Alexa sur différents types cellulaires, la fixation spécifique de rP40-Alexa (trait gras) est mesurée par cytométrie en flux. La fixation d'une protéine non relevante (glycophorine) est représentée en trait fin.

25 Figure 2 : Influence de la concentration de rP40 sur la fixation sur les cellules dendritiques.

Figure 3 : Inhibition de la fixation de rP40-Alexa par rP40 non marquée sur des cellules dendritiques.

Après incubation de cellules dendritiques avec différentes concentrations de rP40 non
30 marquée, rP40-Alexa est ajoutée. La fixation de rP40-Alexa est quantifiée par cytométrie en flux.

Figure 4 : Evaluation de la fixation de différentes protéines marquées sur les cellules dendritiques.

Des protéines porteuses P40, TT (anatoxique tétanique) et BB (dérivées de la protéine
35 G du streptocoque) marquées à l'Alexa sont incubées avec des cellules dendritiques

(trait pl in). Une protéine non relevante est utilisée comme témoin négatif (trait fin). La fixation est mesurée par cytométrie en flux.

Figures 5A et 5B : Internalisation de rP40-Alexa dans les cellules dendritiques.

Après incubation de cellules dendritiques avec rP40-Alexa à 4°C (panel gauche, figure 5A) ou à 37°C (panel droit, figure 5B), les cellules sont observées par microscopie confocale (grossissement x 220).

Exemple 1 : Clonage du gène rP40

Le gène codant pour la protéine recombinante P40 nommée rP40 a été obtenu par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique de *Klebsiella pneumoniae* IP 1145 (Nguyen et col., Gene, 1998). Le fragment de gène codant de rP40 est inséré dans divers vecteurs d'expression, en particulier un vecteur sous le contrôle du promoteur de l'opéron Trp. La séquence d'acides aminés de la protéine rP40 et la séquence nucléotidique codant pour la protéine P40 sont représentées respectivement par les séquences SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 1 dans la liste des séquences ci-après.

Une souche productrice *E. coli* K12, a été transformée par un vecteur d'expression pvaLP40. La protéine rP40 est produite sous forme de corps d'inclusion avec un rendement important (> 10 %, g de protéines/g de biomasse sèche). Cet exemple n'est qu'une illustration de l'expression de la rP40, mais elle peut être étendue à d'autres souches bactériennes ainsi que d'autres vecteurs d'expression.

Exemple 2 : Procédé de fermentation de protéines de fusion rP40

Un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) renfermant de l'Ampicilline (100 µg/ml, Sigma) et de la Tétracycline (8 µg/ml, Sigma) est inoculé avec la souche *E. coli* recombinante décrite ci-dessus. L'incubation est réalisée pendant une nuit à 37°C puis 200 ml de cette culture est utilisée pour ensemer 2 litres de milieu de culture dans un fermenteur (Biolafitte, France). De manière assez classique, le milieu de culture peut être composé d'agents chimiques, supplémentés par les vitamines, des extraits de levure, connus pour avoir une croissance à densité élevée de cellules bactériennes.

Les paramètres contrôlés durant la fermentation sont : le pH, l'agitation, la température, le taux d'oxygénation, l'alimentation de sources combinées (Glycérol ou Glucose). De manière générale, le pH est régulé à 7,0, la température est fixée à 37°C. La croissance est contrôlée en alimentant en glycérol (87 %) à un débit constant (12 ml/h) pour maintenir le signal de tension de l'oxygène dissous à 30 %. Lorsque la

turbidité de la culture (mesurée à 580 nm) atteint la valeur de 80 (après environ 24 heures de culture), la production des protéines est déclenchée par addition de l'acide indole acrylique (IAA) à la concentration finale de 25 mg/l. Environ 4 heures après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation. La quantité de biomasse humide obtenue est d'environ 200 g.

Exemple 3 : Procédé d'extraction et de purification de la protéine rP40

Extraction de la rP40

Après centrifugation du bouillon de culture (4000 rpm, 10 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5. Les insolubles ou corps d'inclusion sont obtenus après un traitement par le lysozyme (0,5 g/litre, 1 heure température ambiante / agitation douce). Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl 25 mM à pH 8,5 et 5 mM MgCl₂, puis centrifugé (15 min à 10 000 g).

On solubilise les corps d'inclusion à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 7 M urée (agent dénaturant) et 10 mM Dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation (15 min à 10 000 g) permet d'éliminer les particules non solubles.

On resuspend ensuite dans 13 volumes de tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant du NaCl (8,76 g/l) et du Zwittergent 3-14 (0,1 %, p/v). La solution est laissée pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce au contact de l'air (favoriser la renaturation de la protéine par dilution et réoxydation des ponts disulfures).

Purification de la protéine rP40

Etape de chromatographie d'échange d'anions.

Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée contre un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 X volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Biorad Macro Prep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus, à un débit linéaire de 15 cm/h. Les protéines sont détectées à 280 nm. La protéine rP40 est éluée, avec un débit linéaire de 60 cm/h, pour une concentration de 0,2 M en NaCl dans le tampon TrisHCl 25 mM, pH 8,5 ; 0,1 % Zwittergent 3-14.

Etape de chromatographie d'échange de cations

Les fractions contenant la protéine rP40 sont poolées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10 kDa) pour des volumes de l'ordre
5 de 100 ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à 4°C contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type
10 échangeur de cations forts (gel Biorad Macro Prep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14. La protéine rP40 est éluée (vitesse 61 cm/h) pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les profils électrophorétiques montrent un degré de pureté de l'ordre de 95 %. L'état de la protéine est suivi par SDS-PAGE. Selon sa forme dénaturée ou native, la protéine P40 extraite de la membrane
15 de *Klebsiella pneumoniae* possède un comportement électrophorétique (migration) caractéristique. La forme native (structure en feuillets β) présente en effet une masse moléculaire plus faible que la forme dénaturée (structure en hélices α) sous l'action d'un agent dénaturant, tel que l'urée ou le chlorhydrate de guanidine, ou par chauffage à 100°C en présence de SDS). La protéine rP40 n'est pas correctement renaturée en
20 fin de renaturation, que celle-ci soit réalisée en absence ou en présence de 0,1 % ; (p/v) Zwittergent 3-14. Par contre, une renaturation totale est obtenue après dialyse contre un tampon Tris/HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % (p/v) de Zwittergent 3-14. Toutefois, il faut noter que cette renaturation n'est obtenue que lorsque l'étape de dilution et le traitement à température ambiante sont réalisés eux-mêmes en présence
25 de Zwittergent 3-14 (résultats négatifs en absence de détergent).

Exemple 4 : Fixation spécifique de rP40 sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Méthodologie

Purification des lymphocytes T humains

30 Les cellules mononucléées (CMN) sont isolées à partir du sang périphérique de volontaires sains par centrifugation (1800 rpm, 20 min, température ambiante), sur un gradient de Ficoll. Après centrifugation, les CMN, situées à l'interface ficoll/plasma, sont récoltées et lavées 2 fois avec du milieu de culture complet (MC) (RPMI 1640 + 10 % SVF + L-glutamine + antibiotique). Les lymphocytes T sont alors isolés par la
35 technique du rosetting qui utilise leur capacité à se fixer aux globules rouges de

mouton (GRM). Brièvement, les CMN sont incubées avec des GRM pendant 1 heure à 4°C. Après centrifugation sur gradient de ficoll, les lymphocytes B et les monocytes sont situés à l'interface alors que les lymphocytes T fixés aux GRM sont dans le culot cellulaire. Après récupération du culot cellulaire et lyse des GRM avec une solution saline hypotonique, la pureté des lymphocytes T est appréciée par cytométrie en flux avec un anticorps anti-CD3 et est supérieure à 95 %.

Purification des monocytes humains

Les monocytes sont purifiés à partir des CMN par sélection positive en utilisant la technologie MACS (Magnetic Activated Cell Sorter). Les CMN sont marquées avec un anticorps anti-CD14 couplé à des particules magnétiques puis passées sur une colonne aimantée. Les monocytes sur lesquels sont fixés les complexes anticorps-colloïde restent dans la colonne alors que les cellules n'ayant pas fixé l'anticorps sont éluées par lavages successifs. Ensuite les monocytes sont décrochés en effectuant des lavages en absence d'aimant. La pureté de la fraction collectée est supérieure à 98 %.

Génération de cellules dendritiques humaines (CD) à partir de monocytes

Les monocytes purifiés sont cultivés à la concentration de 106/ml dans du MC pendant 6 à 7 jours en présence de IL 4 (20 ng/ml) et de GMCSF (20 ng/ml). Les CD générées à ce stade sont des CD immatures qui expriment le CD1a et pas ou peu le CD83. Leur phénotype est vérifié par la technique de cytométrie en flux.

Purification des lymphocytes B humains à partir d'amygdales

Les amygdales sont broyées et les cellules récoltées sont déposées sur un gradient de ficoll. Les CMN recueillies à l'interface sont lavées puis incubées avec des GRM. Après ficoll, les lymphocytes B sont situés à l'interface alors que les lymphocytes T fixés aux GRM sont dans le culot cellulaire. Les lymphocytes B sont alors lavés. Leur pureté, vérifiée par cytométrie en flux, est supérieure à 96%.

Culture des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires RPMI 8866, DAUDI, HL60 et Jurkat sont cultivées dans du MC.

Couplage de rP40 au fluorochrome Alexa488

La concentration de la protéine rP40 est ajustée à 2 mg/ml dans du PBS. A 500 µl de la protéine sont ajoutés 50 µl de bicarbonate de sodium à 1 M. La solution est alors transférée dans un tube de réaction contenant le colorant Alexa488 et le couplage s'effectue à température ambiante. Après 1 h, la réaction de couplage est

arrêtée par ajout de 15 µl d'hydroxylamine. La protéine marquée est séparée du colorant libre par purification sur colonne.

La quantité de rP40 marquée à l'Alexa488 est ensuite estimée par dosage colorimétrique.

- 5 - Etude de la fixation de P40-Alexa488 sur les différentes cellules par cytométrie en flux.

Pour chaque marquage, 200 000 cellules sont lavées avec du tampon FACS (PBS + 1 % BSA + 0,01 % azide de sodium) et resuspendues, dans une plaque 96 puits à fond conique, dans 50 µl de tampon FACS. La protéine P40-Alexa488 ou la
10 protéine contrôle (glycophorine-Alexa488) sont alors ajoutées à 10^{-6} M pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont alors lavées 3 fois avec du tampon FACS puis resuspendues dans 200 µl de ce même tampon et analysées par cytométrie en flux.

Résultat

- 15 La protéine rP40 se fixe sélectivement sur les CPA humaines telles que :
- les monocytes issus du sang périphérique,
 - les cellules dendritiques générées à partir des monocytes du sang périphérique,
 - les lymphocytes B issus d'amygdale, les lignées lymphocytaires B : DAUDI et RPMI 8866 (cf. Fig. 1) et les lymphocytes B issus du sang périphérique (résultat non
20 présenté).

Aucune fixation n'est observée sur des cellules qui ne possèdent pas la capacité de présenter des antigènes tels que des lymphocytes T du sang périphérique non activés, la lignée lymphocytaire T Jurkat non activée et la lignée monocyttaire HL60 non activée.

25

Exemple 5 : La fixation de rP40 aux CD est spécifique

- 1) La fixation de rP40 aux CD est dépendante de la dose.

Méthode

200 000 CD sont lavées avec du tampon FACS et incubées dans 50 µl de
30 tampon en présence de différentes concentrations de rP40 (de 10^{-10} à 5×10^{-6} M) pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon FACS puis resuspendues dans 50 µl de ce même tampon contenant 5 µg/ml d'un anticorps polyclonal de lapin anti-P40 ou d'un anticorps IgG de lapin contrôle. Après 20 minutes d'incubation, les cellules sont relavées et incubées dans
35 100 µl de tampon FACS contenant un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin

marqué à la fluorescéine (dilué au 1:200). Après 20 minutes d'incubation, les cellules sont lavées, reprises dans du tampon FACS et analysées par cytométrie en flux.

Résultat

La fixation de rP40 au CD est significative à partir de 10^{-7} M ($p < 0.001$) et maximale à 2×10^{-6} M (cf. Fig. 2).

2) La protéine rP40 non marquée diminue la fixation de rP40 Alexa488 aux CD.

Méthode

Afin de démontrer la spécificité de la fixation de P40, une compétition entre rP40-Alexa488 et rP40 non marquée a été réalisée. Les CD ont été incubées 10 minutes avec 5×10^{-8} à 2×10^{-6} M de rP40 non marqué puis P40-Alexa488 (utilisé à 2×10^{-6} M) a été ajouté. Après 20 minutes d'incubation à 4°C, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux comme décrit auparavant.

Résultat

La protéine rP40 non marquée inhibe de manière dépendante de la dose la fixation de 2×10^{-6} M de P40 Alexa488 (à plus de 60 % lorsqu'il est utilisé à 2×10^{-6} M) (cf. Fig. 3).

Exemple 6 : Parmi les protéines porteuses, TT, BB et rP40, seule la protéine rP40 se fixe aux CD.

Méthode

Les protéines porteuses, anatoxine tétanique (TT) et BB (d'origine de la protéine G du Streptocoque ayant une affinité à l'albumine humaine), ainsi que la protéine rP40 et la protéine contrôle glycophorine A ont été marquées par Alexa488 comme précédemment décrit. La fixation de ces molécules sur les CD a été évaluée par cytométrie en flux comme décrit auparavant. Brièvement, 200 000 CD sont lavées avec du tampon FACS et incubées dans 50 µl de tampon en présence de 10^{-6} M de chacune des protéines marquées par Alexa488 pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon FACS puis resuspendues dans 200 µl de ce même tampon et analysées par cytométrie en flux.

Résultat

A la concentration de 10^{-6} M, seule rP40 se fixe aux cellules dendritiques. Aucune fixation de TT, BB et glycophorine n'est détectée (cf. Fig. 4).

Exemple 7 : rP40 est internalisée par les CD

Méthode

200 000 CD sont lavées avec du tampon PBS-BSA 1 % et resuspendues, dans une plaque 96 puits à fond conique, dans 50 µl de tampon PBS-BSA (tampon phosphate salin - sérum albumine bovine). La protéine rP40-Alexa488 ou la protéine glycophorine-Alexa488 est alors ajoutée à 2×10^{-6} M. Une cinétique d'internalisation est effectuée en incubant les cellules avec les protéines marquées à l'Alexa, à 37°C, de 15 minutes à 2 heures. Un contrôle négatif d'internalisation est réalisé dans les mêmes conditions en changeant les paramètres suivants : ajout d'azide de sodium 0,01 % au tampon PBS-BSA et incubation des cellules à 4°C avec les protéines marquées à l'Alexa.

Après incubation, les cellules sont alors lavées 3 fois avec du tampon PBS-BSA, resuspendues dans 100 µl de ce même tampon puis cytocentrifugées sur des lames de microscope. Les lames sont ensuite analysées par microscopie confocale.

Résultat

L'observation des cellules incubées à 37°C avec rP40-Alexa montre un marquage intracytoplasmique détectable dès 30 minutes et toujours observé après 2 h d'incubation : un résultat représentatif, obtenu après 1 h d'incubation à 37°C est présenté dans la Figure 5B. Un marquage membranaire mais pas intracytoplasmique est observé lorsque les cellules sont incubées à 4°C avec rP40 (cf. Fig. 5A), alors qu'aucun marquage n'est observé en présence de glycophorine-Alexa (après incubation à 4°C comme à 37°C). L'exemple d'Alexa, molécule chimique, démontre que toute molécule chimique couplée à P40 peut ainsi être délivrée aux cellules présentatrices d'antigènes y compris les cellules dendritiques.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes.

3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B.

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont les cellules dendritiques.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).

10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi les peptides, les lipopeptides,

les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides et les substances chimiques.

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage chimique.

13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou de ladite substance biologiquement active pour faciliter le couplage chimique.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

15. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

16. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 15, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est un antigène ou un haptène.

17. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 16, pour moduler la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

18. Utilisation selon la revendication 17, pour améliorer la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

19. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules présentatrices d'antigènes.

20. Utilisation selon la revendication 19, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules dendritiques.

21. Utilisation selon l'une des revendications 19 et 20, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes,

les allergies, les rejets de greffes, les maladies cardiovasculaires, les maladies du système nerveux central, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses ou les maladies liées à une immunodéficience.

22. Utilisation selon la revendication 21, pour la préparation d'une
5 composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse ou un cancer associé à un antigène tumoral.

23. Utilisation selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant de l'immunité.

24. Utilisation selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisée en ce
10 que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

25. Utilisation selon la revendication 24, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous la forme d'un liposome, d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer une protéine chimérique
15 recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

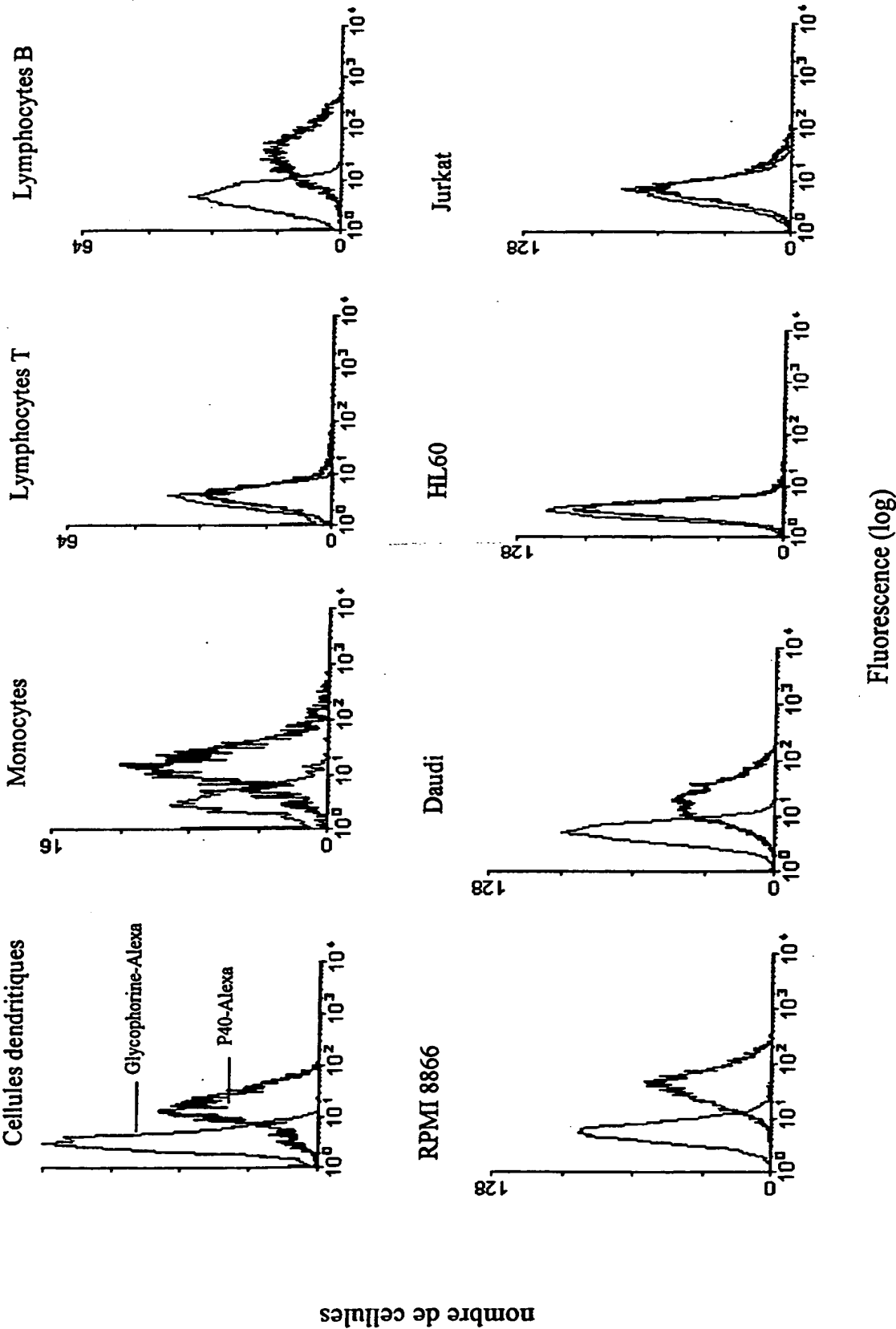


FIGURE 1

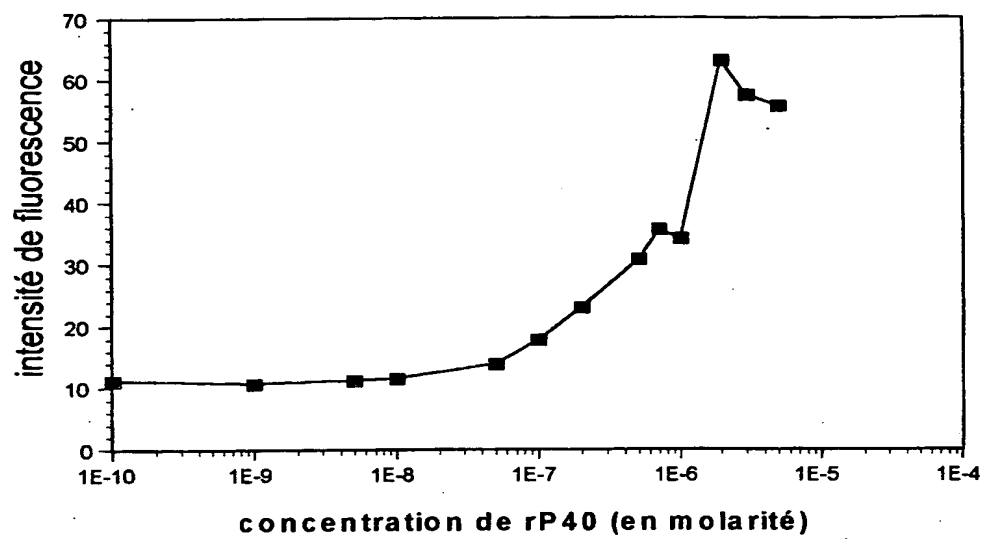


FIGURE 2

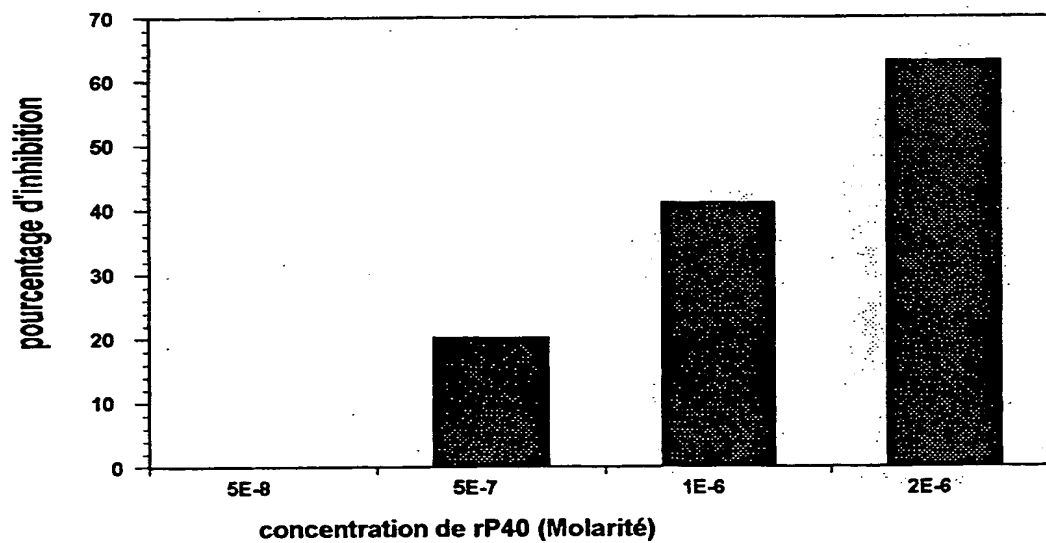


FIGURE 3

3/4

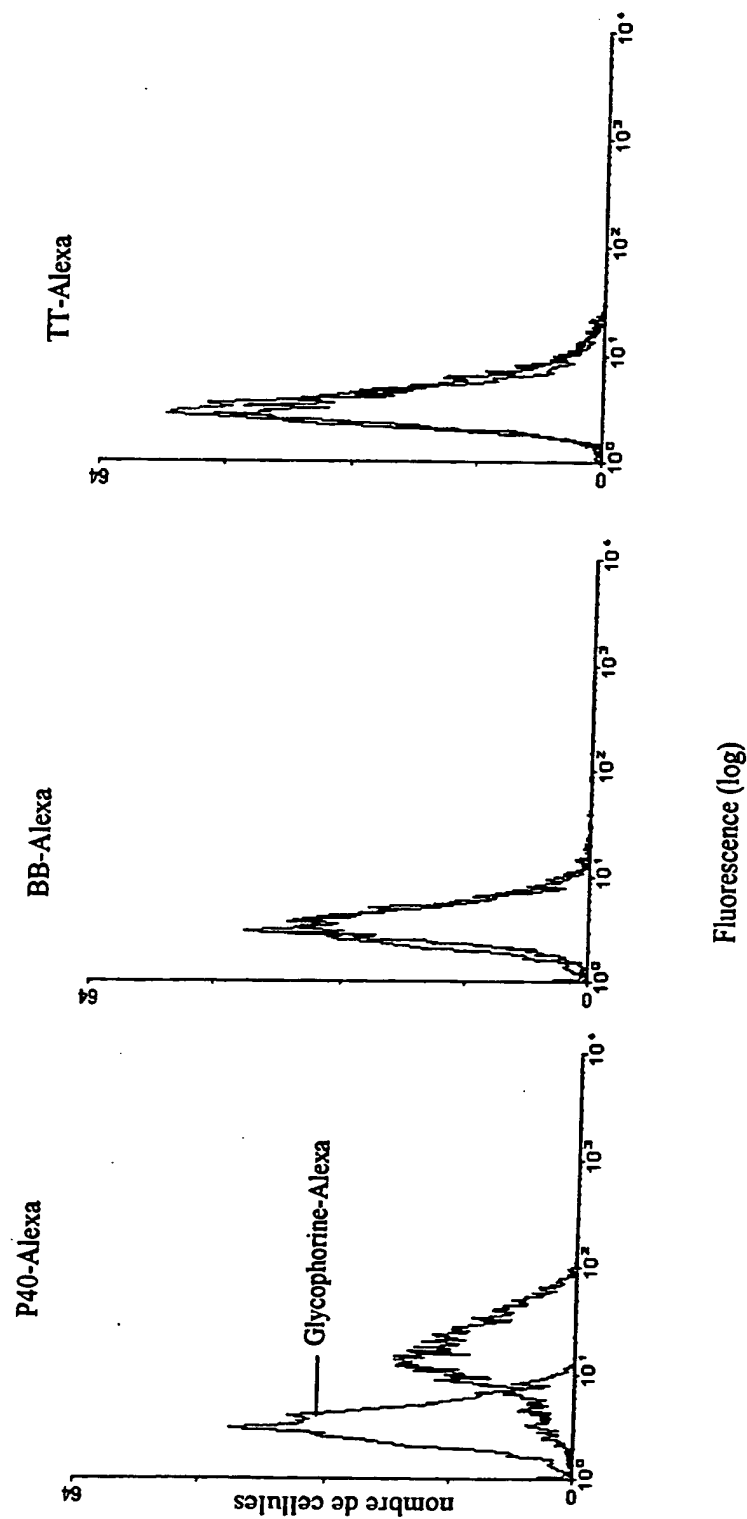


FIGURE 4

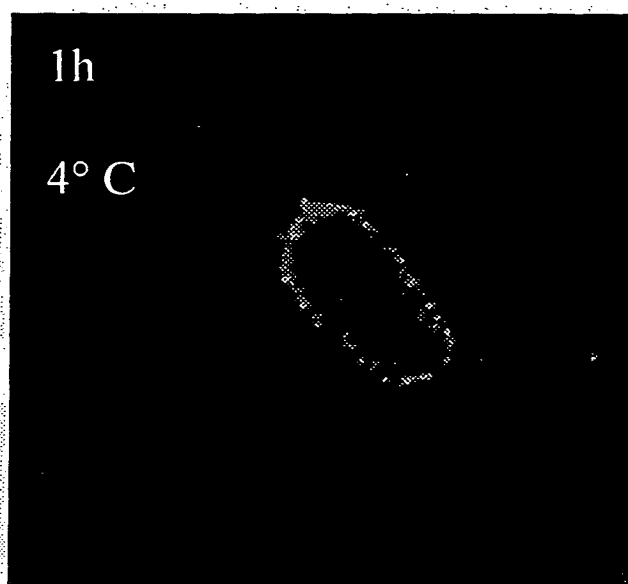


FIGURE 5A

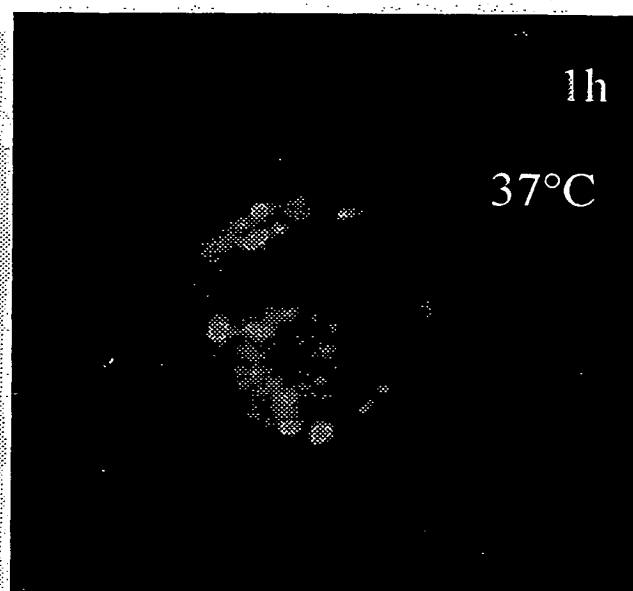


FIGURE 5B

LISTE DE SÉQUENCES

<110> PIERRE FABRE MÉDICAMENT

<120> UTILISATION D'UNE PROTÉINE OmpA D'ENTÉROBACTÉRIE, POUR
LE CIBLAGE SPÉCIFIQUE D'UNE SUBSTANCE BIOLOGIQUEMENT
ACTIVE QUI LUI EST ASSOCIÉE VERS LES CELLULES
PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNES

<130> D17777

<140>

<141>

<150> FR 98 14007

<151> 1998-11-06

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.2

<210> 1

<211> 1035

<212> ADN

<213> Klebsiella pneumoniae

<220>

<221> exon

<222> (1)..(1032)

<220>

<221> intron

<222> (1033)..(1035)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1032)

<400> 1

atg	aaa	gca	att	ttc	gta	ctg	aat	gcg	gct	ccg	aaa	gat	aac	acc	tgg	48
Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	
1				5				10						15		

tat	gca	ggt	ggt	aaa	ctg	ggt	tgg	tcc	cag	tat	cac	gac	acc	ggt	ttc	96
Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	
		20						25					30			

tac	ggt	aac	ggt	ttc	cag	aac	aac	aac	ggt	ccg	acc	cgt	aac	gat	cag	144
Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	
		35					40					45				

ctt	ggt	gct	ggt	gca	ttc	ggt	ggt	tac	cag	gtt	aac	ccg	tac	ctc	ggt	192
Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	
		50				55					60					

ttc	gaa	atg	ggt	tat	gac	tgg	ctg	ggc	cgt	atg	gca	tat	aaa	ggc	agc	240
Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	
	65				70				75					80		

ggt	gac	aac	ggt	gct	ttc	aaa	gct	cag	ggc	gtt	cag	ctg	acc	gct	aaa	288
Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	

85	90	95	
ctg ggt tac ccg atc act gac gat Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp 100	ctg gac atc tac acc cgt Leu Asp Ile Tyr Thr Arg 105	ctg ggc Leu Gly 110	336
ggc atg gtt tgg cgc gct gac tcc aaa ggc aac tac gct tct acc ggc Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly 115	120	125	384
gtt tcc cgt agc gaa cac gac act ggc gtt tcc cca gta ttt gct ggc Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly 130	135	140	432
ggc gta gag tgg gct gtt act cgt gac atc gct acc cgt ctg gaa tac Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr 145	150	155	480
cag tgg gtt aac aac atc ggc gac gcg ggc act gtg ggt acc cgt cct Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro 165	170	175	528
gat aac ggc atg ctg agc ctg ggc gtt tcc tac cgc ttc ggt cag gaa Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu 180	185	190	576
gat gct gca ccg gtt gtt gct ccg gct ccg gct ccg gct ccg gaa gtg Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val 195	200	205	624
gct acc aag cac ttc acc ctg aag tct gac gtt ctg ttc aac ttc aac Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn 210	215	220	672
aaa gct acc ctg aaa ccg gaa ggt cag cag gct ctg gat cag ctg tac Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr 225	230	235	720
act cag ctg agc aac atg gat ccg aaa gac ggt tcc gct gtt gtt ctg Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu 245	250	255	768
ggc tac acc gac cgc atc ggt tcc gaa gct tac aac cag cag ctg tct Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser 260	265	270	816
gag aaa cgt gct cag tcc gtt gtt gac tac ctg gtt gct aaa ggc atc Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile 275	280	285	864
ccg gct ggc aaa atc tcc gct cgc ggc atg ggt gaa tcc aac ccg gtt Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val 290	295	300	912
act ggc aac acc tgt gac aac gtg aaa gct cgc gct gcc ctg atc gat Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp 305	310	315	960
tgc ctg gct ccg gat cgt cgt gta gag atc gaa gtt aaa ggc tac aaa Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys 325	330	335	1008

gaa gtt gta act cag ccg gcg ggt taa
 Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
 340

1035

<210> 2
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Klebsiella pneumoniae

<400> 2
 Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp
 1 5 10 15
 Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln
 35 40 45
 Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly
 50 55 60
 Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser
 65 70 75 80
 Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys
 85 90 95
 Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly
 100 105 110
 Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly
 115 120 125
 Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly
 130 135 140
 Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr
 145 150 155 160
 Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro
 165 170 175
 Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu
 180 185 190
 Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val
 195 200 205
 Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn
 210 215 220
 Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr
 225 230 235 240
 Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser

260 265 270

Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
275 280 285

Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
290 295 300

Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
305 310 315 320

Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
325 330 335

Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
340

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02734

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/385 A61K39/39 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAEUW J F ET AL: "The recombinant Klebsiella pneumoniae outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1998 JUL 15) 255 (2) 446-54., XP002114947 the whole document	1-25
A	WO 97 41210 A (DUKE UNIVERSITY) 6 November 1997 (1997-11-06) the whole document	1-25
A	WO 96 14415 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 17 May 1996 (1996-05-17) cited in the application the whole document	1-25
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2000

Date of mailing of the international search report

22/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02734

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 97 41888 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 13 November 1997 (1997-11-13) the whole document -----</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02734

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9741210 A	06-11-1997	US 5853719 A	29-12-1998
		AU 2821397 A	19-11-1997
		CA 2253632 A	06-11-1997
		EP 0918848 A	02-06-1999
WO 9614415 A	17-05-1996	FR 2726472 A	10-05-1996
		AU 714423 B	06-01-2000
		AU 4119996 A	31-05-1996
		CA 2204510 A	17-05-1996
		EP 0791063 A	27-08-1997
		JP 10508595 T	25-08-1998
		ZA 9509416 A	06-06-1996
WO 9741888 A	13-11-1997	FR 2748476 A	14-11-1997
		AU 2901997 A	26-11-1997
		BR 9708979 A	03-08-1999
		CA 2254084 A	13-11-1997
		CN 1221348 A	30-06-1999
		EP 0914152 A	12-05-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der ie Internationale No
PCT/FR 99/02734

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K39/385 A61K39/39 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HAEUW J F ET AL: "The recombinant Klebsiella pneumoniae outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1998 JUL 15) 255 (2) 446-54., XP002114947 le document en entier ---	1-25
A	WO 97 41210 A (DUKE UNIVERSITY) 6 novembre 1997 (1997-11-06) le document en entier ---	1-25
A	WO 96 14415 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 17 mai 1996 (1996-05-17) cité dans la demande le document en entier ---	1-25
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No
PCT/FR 99/02734

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 97 41888 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 13 novembre 1997 (1997-11-13) le document en entier -----</p>	1-25

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De la Recherche Internationale No
PCT/FR 99/02734

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9741210 A	06-11-1997	US 5853719 A	29-12-1998
		AU 2821397 A	19-11-1997
		CA 2253632 A	06-11-1997
		EP 0918848 A	02-06-1999
WO 9614415 A	17-05-1996	FR 2726472 A	10-05-1996
		AU 714423 B	06-01-2000
		AU 4119996 A	31-05-1996
		CA 2204510 A	17-05-1996
		EP 0791063 A	27-08-1997
		JP 10508595 T	25-08-1998
		ZA 9509416 A	06-06-1996
WO 9741888 A	13-11-1997	FR 2748476 A	14-11-1997
		AU 2901997 A	26-11-1997
		BR 9708979 A	03-08-1999
		CA 2254084 A	13-11-1997
		CN 1221348 A	30-06-1999
		EP 0914152 A	12-05-1999

CLAIMS

1. The use of an enterobacterium OmpA protein, or
5 of a fragment thereof, for preparing a pharmaceutical
composition intended for specific targeting of a
biologically active substance which is associated with
it to antigen-presenting cells.
2. The use as claimed in claim 1, characterized in
10 that said enterobacterium OmpA protein, or a fragment
thereof, binds specifically to antigen-presenting
cells.
3. The use as claimed in either of claims 1 and 2,
characterized in that said enterobacterium OmpA
15 protein, or a fragment thereof, is internalized into
the antigen-presenting cells.
4. The use as claimed in one of claims 1 to 3,
characterized in that said antigen-presenting cells are
chosen from dendritic cells, monocytes and B
20 lymphocytes.
5. The use as claimed in claim 4, characterized in
that said antigen-presenting cells are dendritic cells.
6. The use as claimed in one of claims 1 to 5,
characterized in that said enterobacterium OmpA
25 protein, or a fragment thereof, is obtained from a
culture of said enterobacterium, using an extraction
process.
7. The use as claimed in one of claims 1 to 5,
characterized in that said enterobacterium OmpA
30 protein, or a fragment thereof, is obtained by
recombinant process.
8. The use as claimed in one of claims 1 to 7,
characterized in that said enterobacterium is
Klebsiella pneumoniae.
- 35 9. The use as claimed in claim 8, characterized in
that the amino acid sequence of said OmpA protein, or a
fragment thereof, comprises:
a) the amino acid sequence having the sequence
SEQ ID No 2;

- b) the amino acid sequence of a sequence having at least 80% homology with the sequence SEQ ID No 2; or
c) the amino acid sequence of a fragment, of at least 5 amino acids, of a sequence as defined in a) or b).
- 5 10. The use as claimed in one of claims 1 to 9, characterized in that said biologically active substance is chosen from peptides, lipopeptides, polysaccharides, oligosaccharides, nucleic acids, lipids and chemical substances.
- 10 11. The use as claimed in claim 10, characterized in that said biologically active substance is coupled by covalent attachment with said OmpA protein, or a fragment thereof.
- 15 12. The use as claimed in claim 11, characterized in that the coupling by covalent attachment is chemical coupling.
- 20 13. The use as claimed in claim 12, characterized in that one or more attachment elements is (are) introduced into said OmpA protein, or a fragment thereof, and/or into said biologically active substance, in order to facilitate the chemical coupling.
- 25 14. The use as claimed in claim 13, characterized in that said attachment element introduced is an amino acid.
- 30 15. The use as claimed in claim 11, characterized in that said biologically active substance coupled by covalent attachment with said OmpA protein, or a fragment thereof, is a recombinant chimeric protein resulting from the expression of a nucleic acid construct encoding said biologically active substance and said OmpA protein, or a fragment thereof.
- 35 16. The use as claimed in one of claims 10 to 15, characterized in that said biologically active substance is an antigen or a hapten.
17. The use as claimed in one of claims 1 to 16, for modifying the immune response against an antigen or a hapten.

18. The use as claimed in claim 17, for improving the immune response against an antigen or a hapten.

19. The use as claimed in one of claims 1 to 18, for preparing a pharmaceutical composition intended to prevent or to treat a disease with an active substance the effectiveness of which is modified by and/or linked to the internalization thereof by antigen-presenting cells.

20. The use as claimed in claim 19, for preparing a pharmaceutical composition intended to prevent or to treat a disease with an active substance, the effectiveness of which is modified by and/or linked to the internalization thereof by dendritic cells.

21. The use as claimed in either of claims 19 and 20, for preparing a pharmaceutical composition intended to prevent or to treat cancers, preferably cancers associated with a tumor antigen, autoimmune diseases, allergies, graft rejections, cardiovascular diseases, diseases of the central nervous system, inflammatory diseases, infectious diseases or diseases linked to an immunodeficiency.

22. The use as claimed in claim 21, for preparing a pharmaceutical vaccine composition intended to prevent or to treat an infectious disease or a cancer associated with a tumor antigen.

23. The use as claimed in one of claims 19 to 22, characterized in that said pharmaceutical composition also comprises an adjuvant of immunity.

24. The use as claimed in one of claims 19 to 23, characterized in that said pharmaceutical composition is vehicled in a form which makes it possible to improve the stability and/or immunogenicity thereof.

25. The use as claimed in claim 24, characterized in that said pharmaceutical composition is vehicled in the form of a liposome, of a viral vector or of a transformed host cell capable of expressing a recombinant chimeric protein resulting from the expression of a nucleic acid construct encoding said

biologically active substance and said OmpA protein, or a fragment thereof.

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

Martin Jean-jacques.
CABINET REGIMBEAU
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

ARRIVÉ LE
16 OCT. 2000
CABINET
REGIMBEAU

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 12.10.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
340363/17777

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR99/02734

Date du dépôt international (jour/mois/année)
08/11/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
06/11/1998

Déposant
PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Danti, B

Tél. +49 89 2399-8161





TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340363/17777	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02734	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 06/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K39/385		
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 3 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input checked="" type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 29/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 12.10.2000	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Mennessier, T N° de téléphone +49 89 2399 8687 	

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02734

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-16 version initiale

Revendications, N°:

1-24 reçue(s) avec télécopie du 22/09/2000

Dessins, feuilles:

1/4-4/4 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 1-24.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02734

parce que :

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s 1-24 (en ce qui concerne la possibilité d'application industrielle) en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :

voir feuille séparée

- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :

- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.

- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-24
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-24
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications voir point 3.d) de la feuille séparée
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

1. Commentaires concernant le point I

L'opinion est également établie sur la base des pages 1 à 4 de la liste de séquences.

2. Commentaires concernant le point III

La présente Administration considère que l'objet des revendications 1-25 est visé par les dispositions de la règle 67.1 (iv) PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de ces revendications est susceptible d'**application industrielle** (article 34(4) a) i) PCT).

3. Commentaires concernant le point V

a) Document cité

Il est fait référence au document suivant:

D1: WO 96/14415

Le demandeur pour cette demande internationale PCT est celui de la présente demande en cours d'examen. L'un des inventeurs de D1 est également désigné dans la présente demande.

b) Nouveauté (article 33(2) PCT)

Une utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique telle que définie à la revendication 1 n'est pas en tant que telle décrite dans l'un quelconque des documents cités dans le rapport de recherche internationale. L'objet de la revendication 1 peut donc être considéré comme **nouveau**. Il en va de même *de facto* pour celui des autres revendications (2 à 24), étant donné qu'elles en sont dépendantes.

c) Activité inventive (article 33(3) PCT)

- (i) Il y a lieu de prendre en considération le document D1 estimé représentant l'état de la technique le plus proche.
- (ii) Il concerne notamment une composition pharmaceutique qui est un complexe immunogène comprenant un antigène ou un haptène associé à au moins une partie de la protéine P40 [= OmpA] de *Klebsiella pneumoniae* (voir revendication 8), l'antigène ou l'haptène pouvant être associé à l'adjuvant par une liaison covalente (voir revendication 9) constituant une molécule de fusion dont la préparation fait appel aux techniques du génie génétique (voir revendication 14).
- (iii) Aux lignes 7 à 9 de la page 3, donnant une explication à l'effet d'adjuvant de la protéine P40 mis en évidence, il est suggéré explicitement que la reconnaissance spécifique [des] séquences [d'intérêt de la protéine P40] par des **cellules présentatrices d'antigènes** permettrait de **cibler** ces antigènes vers ces cellules.
- (iv) Par contre, il y a lieu de constater que les lignes 7 à 10 de la page 3 du document D1 ne suggèrent aucunement, qu'elles soient considérées en tant que telles ou en combinaison avec le contenu de l'un quelconque des autres documents cités dans le rapport de recherche internationale, que l'OmpA d'une entérobactérie ou l'un de ses fragments puisse être effectivement internalisé(e) dans les cellules présentatrices d'antigènes. **La revendication 1 apporte donc une solution**, au problème technique posé par la mise en évidence d'un composé capable de se fixer spécifiquement sur de telles cellules puis d'être internalisé, **qui implique une activité inventive**.
- (v) La même conclusion s'applique *de facto* aux revendications dépendantes 2 à 24.

d) Application industrielle (Article 34 PCT)

Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les revendications 1-24 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes.

3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont les cellules dendritiques.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).

9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides et les substances chimiques.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

5 11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage chimique.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou de ladite substance biologiquement active pour faciliter le couplage chimique.

10 13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

14. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

15 15. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est un antigène ou un haptène.

16. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 15, pour moduler la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

20 17. Utilisation selon la revendication 16, pour améliorer la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

18. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules présentatrices d'antigènes.

25 19. Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules dendritiques.

30 20. Utilisation selon l'une des revendications 18 et 19, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes, les allergies, les rejets de greffes, les maladies cardiovasculaires, les maladies du

système nerveux central, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses ou les maladies liées à une immunodéficience.

21. Utilisation selon la revendication 20, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse ou un cancer associé à un antigène tumoral.

22. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant de l'immunité.

23. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 22, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

24. Utilisation selon la revendication 23, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous la forme d'un liposome, d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

PCT

REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum)

340363/17777

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE, POUR LE CIBLAGE SPECIFIQUE D'UNE SUBSTANCE BIOLOGIQUEMENT ACTIVE QUI LUI EST ASSOCIEE VERS LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES

Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

PIERRE FABRE MEDICAMENT
45 Place Abel Gance
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) :
FR

Domicile (nom de l'Etat) :
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☒ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

BONNEFOY Jean-Yves
Les Noyers
74350 LE SAPPEY
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :
FR

Domicile (nom de l'Etat) :
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/ a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme : ☒ mandataire ☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHNER Francis
WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric
CABINET REGIMBEAU
26 Avenue Kléber
75116 PARIS
FRANCE

n° de téléphone

01 45 00 92 02

n° de télécopieur

01 45 00 46 12

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/ n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
<i>Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.</i>	
<p>Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i></p> <p>LECOANET Sybille 41, A1 Résidence du Golf 1196 GLAND SUISSE</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i></p>
Nationalité (nom de l'Etat) : CH	Domicile (nom de l'Etat) : CH
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
<p>Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i></p> <p>AUBRY Jean-Pierre 60 Chemin des Crêts des Crêts 74350 CUVAT FRANCE</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i></p>
Nationalité (nom de l'Etat) : FR	Domicile (nom de l'Etat) : FR
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
<p>Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i></p> <p>JEANNIN Pascale 135 Chemin de Révule 01220 DIVONNE -LES-BAINS FRANCE</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i></p>
Nationalité (nom de l'Etat) : FR	Domicile (nom de l'Etat) : FR
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
<p>Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i></p> <p>BAUSSANT Thierry 35 Rue Jean Jaurès 01200 BELLEGARDE FRANCE</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i></p>
Nationalité (nom de l'Etat) : FR	Domicile (nom de l'Etat) : FR
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
<input type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.	

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être):

Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

- | | |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albanie | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie | <input type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil | <input type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN Chine | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne | <input type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie | <input type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne | <input type="checkbox"/> SE Suède |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande | <input type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input type="checkbox"/> GD Grenade | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input type="checkbox"/> HR Croatie | <input type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IL Israël | <input type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input type="checkbox"/> IN Inde | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input type="checkbox"/> IS Islande | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille:

- ☐ CR Costa Rica ☐ TZ République Unie de Tanzanie
- ☐ DM Dominique

Déclaration concernant les désignations de précaution: outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITÉ				
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale :* office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 06 NOVEMBRE 1998 (06/11/98)	98 14007	FRANCE		
(2)				
(3)				

☒ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : VI

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA/ EP	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année) : 10 SEPTEMBRE 1999 Numéro : FA 570210 Pays (ou office régional) : OEB
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT

La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :

requête	: 4
description (sauf partie réservée au listage des séquences)	: 16
revendications	: 3
abrégé	: 1
dessins	: 4
partie de la description réservée au listage des séquences	: 4
Nombre total de feuilles	: 32

Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :

1. ☐ feuille de calcul des taxes
2. ☐ pouvoir distinct signé à suivre (2)
3. ☐ copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant :
4. ☐ explication de l'absence d'une signature
5. ☒ document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) :
6. ☐ traduction de la demande internationale en (langue) :
7. ☐ indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés
8. ☒ listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur
9. ☒ autres éléments (préciser) : **Copie du Rapport de Recherche**

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :

Langue de dépôt de la demande internationale : **Français**

Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE

À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.

WARCOIN Jacques

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
26, Avenue Kléber
75116 PARIS FRANCE

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :

3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :

4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :

5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : **ISA/**6. ☐ Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

Réservé au Bureau international

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Martin Jean-jacques.
CABINET REGIMBEAU
26, avenue Klébér
F-75116 Paris
FRANCE

[stamp]

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)
12.10.2000

Applicant's or agent's file reference
340363/17777

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/FR99/02734

International filing date (day/month/year)
08/11/1999

Priority date (day/month/year)
06/11/1998

Applicant
PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized officer:



Danti, B

Tel. +49 89 2399-8161

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 340363/17777	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02734	International filing date (day/month/year) 08 November 1999 (08.11.99)	Priority date (day/month/year) 06 November 1998 (06.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/385		
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29 May 2000 (29.05.00)	Date of completion of this report 12 October 2000 (12.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02734

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-16, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-24, filed with the letter of 22 September 2000 (22.09.2000),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02734

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-24.

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-24
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION
REPORT**

International application
No.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The opinion is also established on the basis of pages 1 to 4 of the list of sequences.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION
REPORT

International application
No.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I I I

The present Authority considers that the subject matter of Claims 1-25 falls under the provisions of PCT Rule 67.1(iv). For this reason, no opinion will be given as to whether the subject matter of these claims is **industrially applicable** (PCT Article 34(4)(a)(i)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02734

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	see Box 3. (d) on separate sheet	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

a) Cited document

The following document is referred to:

D1: WO 96/14415

The same applicant has filed the above PCT international application and the present application under examination. One of the inventors of D1 is also named in the present application.

b) Novelty (PCT Article 33(2))

The use of an enterobacterium protein OmpA or of a fragment thereof to prepare a pharmaceutical composition such as defined in Claim 1 is not as such described in any one of the documents cited in the International Search Report. The subject matter of Claim 1 can therefore be considered **novel**. The same applies de facto to that of the other claims (2 to 24), as they are dependent on it.

c) Inventive step (PCT Article 33(3))

- (i) Document D1 is thought to be the closest prior art and should be taken into consideration.
- ii) It concerns in particular a pharmaceutical composition which is an immunogenic complex comprising an antigen or a hapten combined with at least a portion of *Klebsiella pneumoniae* protein P40[= OmpA] (see Claim 8). The antigen or hapten can be associated with the adjuvant by a covalent bond (see Claim 9) constituting a fusion molecule, the preparation of which involves genetic engineering techniques (see Claim 14).
- (iii) On page 3, lines 7 to 9, in which the adjuvant effect of the protein P40 obtained is explained, it is explicitly suggested that specific recognition [of the P40 protein] sequences [of interest] by **antigen-presenting cells** would make it possible to **target** these antigens towards those cells.
- (iv) However, it should be noted that lines 7 to 10 of page 3, document D1, do not in any way suggest, whether they are considered in themselves or in combination with any one of the other documents cited in the International Search Report, that the OmpA of an enterobacterium or a fragment thereof could be effectively internalised into antigen-presenting cells. **Claim 1 thus provides a solution** to the technical problem of providing a compound which can

specifically attach itself to such cells and then be internalised, **which involves an inventive step.**

(v) The same conclusion applies de facto to dependent Claims 2 to 24.

d) Industrial Application (PCT Article 34)

There is no single criterion among the States party to the PCT for determining whether Claims 1-24 are industrially applicable. Patentability can also depend on the way in which the claims have been formulated. Thus, the European Patent Office does not consider the subject matter of claims to the use of a compound for medical purposes to be industrially applicable. But claims to the first use of a known compound for medical purposes can be accepted, as can claims relating to the first use of such a compound in producing a drug to be used in a new medical treatment.

PATENT COOPERATION TREATY



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference 340363/17777	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02734	International filing date (day/month/year) 08/11/1999	Priority date (day/month/year) 06/11/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/385		
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 6 sheets including this title page.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 3 sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29/05/2000	Date of completion of this report 12.10.2000
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465	Authorized officer: Mennessier, T  Telephone No. +49 89 2399 8687

I. Basis of the report

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments.)*:

Description, pages:

1-16 as originally filed

Claims, No.:

1-24 received with the letter of 22/09/2000

Drawings, sheets:

1/4-4/4 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages:

☐ the claims, Nos.:

☐ the drawings, sheets:

3. ☐ The present report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated as follows (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been and will not be examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1-24

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-24 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes:	Claims	1-24
	No:	Claims	
Inventive Step	Yes:	Claims	1-24
	No:	Claims	
Industrial Applicability	Yes:	Claims	see point 3.d) on separate sheet
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

1. Comments with regard to point I

The opinion is also established on the basis of pages 1 to 4 of the sequence listing.

2. Comments with regard to point III

The present administration considers that the subject-matter of claims 1 to 25 is referred to by the provisions of rule 67.1 (iv) PCT. For this reason, an opinion will not be given with regard to the question of determining whether the subject-matter of these claims is capable of **industrial application** (article 34(4) a) i) PCT).

3. Comments with regard to point V

a) Document cited

Reference is made to the following document:

D1: WO 96/14415

The applicant for that PCT international application is that of the present application undergoing examination. One of the inventors of D1 is also named in the present application.

b) Novelty (article 33(2) PCT)

A use of an enterobacterium OmpA protein, or of a fragment thereof, for preparing a pharmaceutical composition as defined in claim 1 is not, as such, disclosed in any one of the documents in the international search

report. The subject-matter of claim 1 can therefore be considered to be **novel**. The same is true, *de facto*, for that of the other claims (2 to 24), given that they are dependent thereon.

c) Inventive step (article 33(3) PCT)

- (i) There is reason to take into consideration document D1 which is believed to represent the closest state of the art.
- (ii) It relates in particular to a pharmaceutical composition which is an immunogenic complex comprising an antigen or a hapten associated with at least one portion of the *Klebsiella pneumoniae* P40 protein [= OmpA] (see claim 8), the antigen or hapten possibly being associated with the adjuvant by a covalent attachment (see claim 9), constituting a fusion molecule the preparation of which makes use of genetic engineering techniques (see claim 14).
- (iii) In lines 7 to 9 of page 3, which give an explanation for the adjuvant effect of the P40 protein demonstrated, it is suggested explicitly that the specific recognition [of the] sequences [of interest of the P40 protein] by

antigen-presenting cells would make it possible to target these antigens to these cells.

- (iv) On the other hand, there is reason to note that lines 7 to 10 of page 3 of document D1 do not in any way suggest, whether they are considered as such or in combination with the content of any one of the other documents cited in the international search report, that the OmpA of an enterobacterium, of a fragment thereof, may be effectively internalized into the antigen-presenting cells. **Claim 1 therefore provides a solution,** to the technical problem posed by the demonstration of a compound capable of binding specifically to such cells and then of being internalized, **which involves an inventive step.**

- (v) The same conclusion applies, *de facto*, to the dependent claims 2 to 24.

d) Industrial application (Article 34 PCT)

There is no unified criterion within the PCT member States for determining whether claims 1 to 24 are capable of industrial application. The patentability may also depend on the

manner in which the claims have been formulated. Thus, the European Patent Office does not consider the subject-matter of claims of use of a compound for medical purposes to be capable of industrial application. On the other hand, claims relating to a known compound, for a first use for medical purposes, and also claims relating to the use of such a compound in the manufacture of a medicinal product with a view to a novel medical treatment, may be accepted.

ONLY FOR INFORMATION

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia-Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	Former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Ivory Coast	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

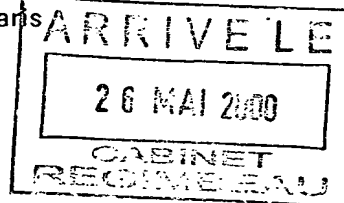
TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA
COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**
(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:
MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE



Date d'expédition (jour/mois/année) 18 mai 2000 (18.05.00)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340363/17777		AVIS IMPORTANT
Demande internationale no PCT/FR99/02734	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 novembre 1999 (08.11.99)	
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT etc		Date de priorité (jour/mois/année) 06 novembre 1998 (06.11.98)

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU,CN,JP,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
BR,CA,EP,MX,ZA

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 18 mai 2000 (18.05.00) sous le numéro WO 00/27432

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

Suite du formulaire PCT/IB/308

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE
LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**

Date d'expédition (jour/mois/année) 18 mai 2000 (18.05.00)	AVIS IMPORTANT
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340363/17777	Demande internationale no PCT/FR99/02734
<p>Il est notifié au déposant que, au moment de l'établissement du présent avis, le délai fixé à la règle 46.1 pour le dépôt de modifications selon l'article 19 n'était pas encore expiré et que le Bureau international n'avait pas reçu de modifications ni de déclaration l'informant que le déposant ne souhaitait pas présenter de modifications.</p>	



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 39/385, 39/39, A61P 31/00, 35/00, 37/00	A1	(11) Numér de publication internationale: WO 00/27432 (43) Date de publication internationale: 18 mai 2000 (18.05.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02734 (22) Date de dépôt international: 8 novembre 1999 (08.11.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/14007 6 novembre 1998 (06.11.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BONNEFOY, Jean-Yves [FR/FR]; Les Noyers, F-74350 Le Sappey (FR). LECOANET, Sybille [CH/CH]; 41, A1 Résidence du Golf, CH-1196 Gland (CH). AUBRY, Jean-Pierre [FR/FR]; 60, chemin des Crêts des Crêts, F-74350 Cuvat (FR). JEANNIN, Pascale [FR/FR]; 135, chemin de Révule, F-01220 Divonne-les-Bains (FR). BAUSSANT, Thierry [FR/FR]; 35, rue Jean Jaurès, F-01200 Bellegarde (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, JP, MX, US, ZA, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: USE OF AN ENTEROBACTERIUM PROTEIN OmpA FOR SPECIFIC TARGETING TOWARDS ANTIGEN-PRESENTING CELLS (54) Titre: UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE, POUR LE CIBLAGE SPECIFIQUE VERS LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES (57) Abstract <p>The invention concerns the use of an enterobacterium protein OmpA, preferably <i>Klebsiella pneumoniae</i> P40 protein, for specific targeting of a biologically active substance associated therewith towards antigen-presenting cells, in particular human dendritic cells. The invention also concerns the use of the OmpA protein for preparing a pharmaceutical composition for preventing and/or treating diseases, in particular cancers related to a tumour-associated antigen, autoimmune diseases or infectious diseases.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, de préférence la protéine P40 <i>klebsiella pneumoniae</i>, pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques humaines. L'invention a également pour objet l'utilisation de la protéine OmpA pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention et/ou le traitement de maladies, notamment les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes ou les maladies infectieuses.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		